

**Komórki HaCaT-ras A5 | 300494****Informacje ogólne****Description**

Komórki HaCaT-ras A5 są spontanicznie unieśmiertelnioną, nienowotworową linią komórek keratynocytów ludzkiej skóry, odgrywającą kluczową rolę w badaniu interakcji mikrośrodowiska guza i progresji raka skóry. Pochodzące od 62-letniego mężczyzny rasy kaukaskiej, komórki te zostały poddane selekcji klonalnej i mutagenezie, co w połączeniu z autokrynną regulacją czynnika wzrostu umożliwia tworzenie wolno rosnących, wysoce zróżnicowanych łagodnych guzów torbielowatych u myszy Balb/c-nu/nu. Czyni to z nich cenny model do badania dynamiki komórkowej i molekularnych mechanizmów progresji nowotworu in vivo.

Komórki HaCaT-ras A5 są szczególnie przydatne do wyjaśnienia złożonych interakcji między komórkami nowotworowymi a otaczającymi je komórkami zrębu, w tym fibroblastami, komórkami odpornościowymi i komórkami śródbłonna. W interakcjach tych pośredniczy wydzielanie różnych cząsteczek sygnalizacyjnych, takich jak czynniki wzrostu, cytokiny i proteazy, wśród których kluczową rolę odgrywa interleukina-6 (IL-6). Wiadomo, że IL-6 ulega rozregulowaniu w wielu typach nowotworów, głównie poprzez nadekspresję lub trwałą aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT3.

Badania wykazały, że stymulacja IL-6 komórek HaCaT-ras A5 znacznie zwiększa ich proliferację poprzez szlak sygnalizacyjny JAK/STAT, podczas gdy fibroblasty pozostają nienaruszone z powodu silniejszego hamowania przez SOCS3, negatywny regulator tego szlaku. Ta zróżnicowana odpowiedź została uchwycona w modelu matematycznym opisującym dynamikę STAT3 i SOCS3, zapewniając głębsze zrozumienie kaskad sygnalizacyjnych specyficznych dla komórek.

Co więcej, IL-6 nie tylko bezpośrednio wpływa na proliferację komórek HaCaT-ras A5, ale także pośrednio wpływa na środowisko komórkowe poprzez aktywację sieci czynników wzrostu, takich jak HGF, KGF, VEGF i IL-8. Analiza ekspresji genów obejmująca ponad 16 000 genów wykazała, że stymulacja IL-6 zwiększa regulację 19 genów związanych ze szlakiem sygnałowym interferonu zarówno w komórkach HaCaT-ras A5, jak i fibroblastach, co koreluje z obserwowanym zahamowaniem wzrostu fibroblastów.

Odkrycie kluczowej roli SerpinB4 w proliferacji komórek HaCaT-ras A5, potwierdzone przez eksperymenty knockdown siRNA, podkreśla skomplikowaną regulację IL-6 zarówno w komórkach nowotworowych, jak i zrębowych. To kompleksowe zrozumienie roli IL-6 zwiększa potencjał rozwoju ukierunkowanych strategii terapeutycznych mających na celu modulację szlaków sygnałowych IL-6 w mikrośrodowisku guza.

Ogólnie rzecz biorąc, komórki HaCaT-ras A5 oferują solidny model do badania złożonych interakcji w mikrośrodowisku guza, torując drogę do nowych podejść w badaniach nad rakiem i rozwoju terapii.

**Organism** Człowiek**Tissue** Skóra**Synonyms** Klon HaCaT-ras A-5, HaCaT A-5, A-5, A5**Charakterystyka****Age** 62 lata**Gender** Mężczyzna

**Komórki HaCaT-ras A5 | 300494****Ethnicity**      Kaukaski**Cell type**      Keratynocyt**Growth properties**      Adherent**Dane regulacyjne****Citation**      HaCaT-ras A5 (numer katalogowy Cytion 300494)**Biosafety level**      1**NCBI\_TaxID**      9606**CellosaurusAccession**      CVCL\_xK16**Depositor**      DKFZ, Heidelberg**GMO Status**      GMO-S1: Ta linia HaCaT-ras A5 zawiera plazmidowy konstrukt onkogenu c-Ha-ras do badań nad transformacją nabłonkową. Ta klasyfikacja ma zastosowanie wyłącznie w Niemczech i może różnić się w innych krajach.**Dane biomolekularne****Protein expression**      P53 (+), CEA (+),**Tumorigenic**      Powstawanie łagodnych guzów u myszy Balb/c-nu/nu.**Karyotype**      Aneuploidalny (hipotetraploidalny)**Obsługa****Culture Medium**      DMEM, w: 4,5 g/l glukozy, w: 4 mM L-glutaminy, w: 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, w: 1,0 mM pirogronianu sodu (numer artykułu Cytion 820300a)**Supplements**      Uzupelnic podloze 10% FBS

**Komórki HaCaT-ras A5 | 300494****Dissociation Reagent**

Mieszanka 1:1 EDTA (zapas: 0,05%) i trypsyny (zapas: 0,1%) musi być przygotowana za każdym razem przed odłączeniem komórek przy użyciu PBS bez Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>, aby zapewnić fizjologiczną osmolarność. Nie zaleca się stosowania gotowych do użycia mieszanin trypsyny/EDTA, ponieważ może to prowadzić do zbrylania się komórek. Alternatywnie można użyć TrypLETM Express (Life Technologies) zamiast trypsyny/EDTA. Należy postępować zgodnie z protokołem producenta.

**Subculturing**

1. **Usuń starą pożywkę:** Usunąć starą pożywkę z kolb.
2. **Płukanie komórek:** Dodaj 3-5 ml PBS (bez wapnia i magnezu) do kolb T25 lub 5-10 ml do kolb T75, aby przemyć przylegające komórki.
3. **Dodać roztwór EDTA:** Całkowicie przykryj warstwę komórek świeżo przygotowanym 0,05% roztworem EDTA - użyj 1-2 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75.
4. **Inkubacja:** Inkubować kolby w temperaturze 37 stopni Celsjusza przez 10 minut.
5. **Dodać roztwór trypsyny/EDTA:** Po inkubacji dodaj świeżo przygotowany roztwór trypsyny/EDTA (0,05% trypsyny, 0,025% EDTA) do kolb, upewniając się, że komórki są w pełni pokryte - użyj 1 ml dla kolb T25 i 2,5 ml dla kolb T75.
6. **Monitorowanie oderwania:** Obserwować komórki, które powinny oddzielić się w ciągu 1-2 minut.
7. **Zneutralizuj trypsynę:** Dodaj pożywkę zawierającą FBS, aby zatrzymać aktywność trypsyny.
8. **Przenieś komórki:** Przenieś zawiesinę komórek do nowych kolb wypełnionych świeżym podłożem hodowlanym.

**Split ratio**

Zalecany jest stosunek 1:5 do 1:10

**Seeding density**

$1 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup>

**Fluid renewal**

2 razy w tygodniu

**Freeze medium**

Jako pożywki do kriokonserwacji używamy kompletnej pożywki wzrostowej (w tym FBS) + 10% DMSO w celu zapewnienia odpowiedniej żywotności po rozmrożeniu lub CM-1 (numer katalogowy Cytion 800100), która zawiera zoptymalizowane osmoprotektanty i stabilizatory metaboliczne w celu zwiększenia regeneracji i zmniejszenia stresu wywołanego kriokonserwacją.

**Komórki HaCaT-ras A5 | 300494****Thawing and  
Culturing Cells**

1. Upewnij się, że fiolka pozostaje głęboko zamrożona w momencie dostawy, ponieważ komórki są wysyłane w suchym lodzie, aby utrzymać optymalną temperaturę podczas transportu.
2. Po otrzymaniu należy natychmiast przechowywać fiolkę w temperaturze poniżej  $-150^{\circ}\text{C}$ , aby zapewnić zachowanie integralności komórek, lub przejść do kroku 3, jeśli wymagana jest natychmiastowa hodowla.
3. W przypadku natychmiastowej hodowli należy szybko rozmrozić fiolkę, zanurzając ją w łaźni wodnej o temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  z czystą wodą i środkiem przeciwdrobnoustrojowym, delikatnie mieszając przez 40-60 sekund, aż pozostanie niewielka grudka lodu.
4. Wykonaj wszystkie kolejne kroki w sterylnych warunkach w kapturze przepływowej, dezynfekując fiolkę 70% etanolem przed otwarciem.
5. Ostrożnie otworzyć zdezynfekowaną fiolkę i przenieść zawiesinę komórek do 15 ml probówki wirówkowej zawierającej 8 ml podłoża hodowlanego o temperaturze pokojowej, delikatnie mieszając.
6. Wirować mieszaninę z prędkością  $300 \times g$  przez 3 minuty w celu oddzielenia komórek i ostrożnie odrzucić supernatant zawierający pozostałości pożywki do zamrażania.
7. Delikatnie ponownie zawiesić osad komórek w 10 ml świeżego podłoża hodowlanego. W przypadku komórek przylegających, rozdzielić zawiesinę pomiędzy dwie kolby hodowlane T25; w przypadku hodowli zawieszonych, przenieść całą pożywkę do jednej kolby T25 w celu promowania skutecznej interakcji i wzrostu komórek.
8. Przestrzegaj ustalonych protokołów podhodowli w celu ciągłego wzrostu i utrzymania linii komórkowej, zapewniając wiarygodne wyniki eksperymentów.

**Incubation  
Atmosphere**

$37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , nawilżona atmosfera.

**Flask Coating**

Brak

**Freezing  
Procedure**

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około  $-78^{\circ}\text{C}$  przez czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

## Komórki HaCaT-ras A5 | 300494

### Shipping Conditions

Linie komórkowe poddane kriokonserwacji są wysyłane w suchym lodzie w zatwierdzonych, izolowanych opakowaniach z wystarczającą ilością czynnika chłodniczego, aby utrzymać temperaturę około -78°C przez cały czas transportu. Po otrzymaniu przesyłki należy natychmiast sprawdzić pojemnik i bezzwłocznie przenieść fiolki do odpowiedniego miejsca przechowywania.

### Storage Conditions

W celu długotrwałego przechowywania należy umieścić fiolki w ciekłym azocie w fazie lotnej w temperaturze od -150 do -196 °C. Przechowywanie w temperaturze -80 °C jest dopuszczalne tylko jako krótki etap przejściowy przed przeniesieniem do ciekłego azotu.

## Kontrola jakości / Profil genetyczny / HLA

### Sterility

Zanieczyszczenie mykoplazmą jest wykluczone przy użyciu zarówno testów opartych na PCR, jak i metod wykrywania mykoplazmy opartych na luminescencji.

Aby upewnić się, że nie ma zanieczyszczenia bakteriami, grzybami lub drożdżami, hodowle komórkowe są poddawane codziennym kontrolom wizualnym.

### Profil STR

**Amelogenin:** x,x  
**CSF1PO:** 9,11  
**D13S317:** 10,12  
**D16S539:** 9,12  
**D5S818:** 12  
**D7S820:** 9,11  
**TH01:** 9.3  
**TPOX:** 11,12  
**vWA:** 16,17  
**D3S1358:** 16  
**D21S11:** 28,30.2  
**D18S51:** 12  
**Penta E:** 7,12  
**Penta D:** 11,13  
**D8S1179:** 14  
**FGA:** 24

### Allele HLA

**A\*:** '31:01:02  
**B\*:** '40:01:02, '51:01:01  
**C\*:** '03:04:01, '15:02:01  
**DRB1\*:** '04:01:01, '15:01:01G  
**DQA1\*:** '01:02:01, '03:03:01  
**DQB1\*:** '03:01:01, '06:02:01  
**DPB1\*:** '03:01:01G, '04:01:01G  
**E:** '01:03:01, '01:03:02